



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANE DAS NEVES BURGOS

***Escherichia coli* enteroagregativa EM PACIENTES HIV
POSITIVOS COM DIARREIA NO NORTE DO PARANÁ -
BRASIL**

TATIANE DAS NEVES BURGOS

***Escherichia coli* enteroagregativa EM PACIENTES HIV
POSITIVOS COM DIARREIA NO NORTE DO PARANÁ -
BRASIL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Burgos, Tatiane das Neves.

Escherichia coli enteroagregativa EM PACIENTES HIV POSITIVOS COM DIARREIA NO NORTE DO PARANÁ - BRASIL / Tatiane das Neves Burgos. - Londrina, 2017. 47 f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* - Tese. 2. enteroagregativa - Tese. 3. PVHA - Tese. 4. fezes diarreica - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

TATIANE DAS NEVES BURGOS

***Escherichia coli* enteroagregativa EM PACIENTES HIV POSITIVOS
COM DIARREIA NO NORTE DO PARANÁ - BRASIL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de dezembro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais: **Aparecida das Neves Burgos** e **Geraldo Burgos Heras** os maiores e melhores tesouros que eu poderia possuir em minha vida, como singela retribuição por todo amor abnegado, carinho e dedicação a mim conferidos. E ao homem da minha vida, meu esposo, **Carlos Henrique** pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente os de incertezas, comuns para quem trilha novos caminhos. Sem vocês nenhuma de minhas conquistas valeriam a pena!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus por sua misericórdia e infindas bênçãos derramadas em minha vida, por seu cuidado e amor, por se revelar e me tomar em suas mão nos momentos em que mais necessitei a Quem tenho prazer em amar e servir.

Aos meus amados pais e as minhas queridas irmãs Marcella e Cinthya por todo apoio, carinho, compreensão, segurança e principalmente felicidade que trazem em minha vida. Em especial a Cinthya que me auxiliou diretamente em seu estágio.

Ao meu amado esposo Carlos Henrique, meu grande incentivador, amigo e apoio, aquele que sempre me motivou a não desistir e sempre me faz acreditar que posso mais, meu encorajador, meu motivador aquele que me faz a mulher mais feliz do mundo.

À minha orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, por sempre estar ao meu lado, pela segurança que me propocionou nos momentos em que precisei, por ser uma força nos momentos em que pensei em desistir, pela confiança, dedicação, paciência e pelos conhecimentos e conselhos transmitidos com muita sabedoria, não só pelos ensinamentos profissionais mas também pelas lições de vida. Afinal, foram dois anos de orientação como iniciação científica, dois anos de orientação no mestrado e mais quatro anos de doutorado, ganhei mais que uma orientadora nesses oito anos, uma amiga e uma querida madrinha que levarei para toda a vida.

Ao meu querido amigo que diretamente se envolveu neste trabalho Paulo Alfonso Schuroff, sem você as incansáveis PCR seriam inviáveis assim como os cálculos estatísticos, por sempre estar pronto a ajudar mesmo quando longe se preocupando com o resultado do trabalho.

À minha querida amiga Angélica, por todo apoio, amizade, experiência e conhecimentos a mim transmitidos. Pela disponibilidade em auxiliar nas árduas coletas para análise, sem seu esforço diretamente este trabalho não aconteceria.

Gostaria de agradecer também aos amigos do laboratório de Bacteriologia: Prof. Dr. Sérgio Rocha, Tainara Waldrich, Anahí, João, Kawana e Caroline pela colaboração em meus experimentos e momentos de alegria e assim contribuíram de diferentes formas para que este trabalho acontecesse.

**“Feliz o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento.”**

(Provérbios 3:13)

Burgos, Tatiane das Neves. ***Escherichia coli* enteroagregativa EM PACIENTES HIV POSITIVOS COM DIARREIA NO NORTE DO PARANÁ – BRASIL**. 2017. 47 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patógeno causador de doenças gastrointestinais, particularmente em pacientes imunocomprometidos, resultando em significativa morbidade e mortalidade. Assim, o trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de EAEC em pacientes hospitalizados infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no estado do Paraná, Brasil. EAEC foi pesquisada em 275 cepas oriundas de fezes diarreicas de 55 pacientes PVHA (pessoa vivendo com HIV/Aids) do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, através da pesquisa de genes de virulência pela técnica da PCR, teste de aderência em células HEp-2, biofilme, sorotipagem, teste de sensibilidade a antimicrobianos e filogenia. EAEC foi detectada em 14 (25,4%) pacientes PVHA e todas as amostras apresentaram o padrão de adesão agregativo em células HEp-2 e foram classificadas em três grupos filogenéticos: A (35,7%), B1 (42,9%) e D (21,4%). Nelas ainda, foram identificados 12 sorotipos diferentes: O168:H4, O105ab:H6, O59:H19, O59:H6, O120:H25, O43:H2, O159:H?, O145:H34, O32:H14, O8:H51, O175:H28, O44:H18. Foi verificada a resistência intermediária em três cepas (21,4%) para Cefalotina e duas (14,3%) foram resistentes para Trimetropin/Sulfametoxazol. Foram classificadas como formadoras de biofilme 13 cepas (92,9%). Ainda as EAEC identificadas foram classificadas em dois grupos: EAEC típica quando apresentava o gene *aggR* (57,1%) e EAEC atípica quando não apresentava esse gene (42,9%). Destaca-se o ineditismo deste trabalho uma vez que é o primeiro no Brasil a pesquisar EAEC em pacientes PVHA com diarreia e os resultados mostraram uma alta prevalência de EAEC neste grupo.

Palavras- chave: *Escherichia coli* enteroagregativa. PVHA. Fezes diarreica.

Burgos, Tatiane da Neves. **Enteroaggregative *Escherichia coli* IN HIV POSITIVE PATIENTS WITH DIARRHEA IN NORTH OF PARANÁ - BRAZIL.** 2017. 47 pp. Thesis (Doctorate in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathogen that causes gastrointestinal diseases, particularly in immunocompromised patients, resulting in significant morbidity and mortality. This study aimed to verify the prevalence of EAEC in hospitalized patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) in the state of Paraná, Brazil. EAEC was investigated in 275 *E. coli* isolates from diarrheal stools from 55 PLWHA (people living with hiv/Aids) patients hospitalized in the University Hospital of the State University of Londrina. EAEC was characterized and the presence of virulence factors evaluated using by PCR, a HEp-2 cell adherence test, and assays for biofilm formation, serotyping, and sensitivity to antimicrobials, along with analysis of phylogeny. EAEC was detected in 14 (25.4%) PLWHA patients. All strains detected exhibited an aggregate adhesion pattern in HEp-2 cells and were classified into three phylogenetic groups: A (35.7%), B1 (42.9%), and D (21.4%). In addition, 12 different serotypes were identified: O168:H4, O105ab:H6, O59:H19, O59:H6, O120:H25, O43:H2, O159:H-, O145:H34, O32:H14, O175:H28, and O44:H18. Intermediate resistance for cephalothin was verified in three strains (21.4%) and two (14.3%) were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole. Thirteen strains (92.9%) were classified as biofilm forming agents. In addition, the EAECs were classified into two groups according to the presence of the *aggR* gene: EAEC typical (*aggR*-positive; 57.1%) and atypical EAEC (*aggR*-negative; 42.9%). It stands out the novelty of this work since it is the first in Brazil to research EAEC in HIV infected patients with diarrhea and the results demonstrate a high prevalence of EAEC in this group.

keywords: Enteroaggregative *Escherichia coli*. PLWHA. Diarrheic stools.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1.	doença diarreica em pacientes imunocomprometidos com HIV	10
2.2.	<i>Escherichia coli</i>	11
2.3.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	13
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4	ARTIGO CIENTÍFICO	26
5	CONCLUSÕES	47

1 INTRODUÇÃO

A infecção diarreica apesar do avanço da medicina, ainda é responsável por um alto índice de mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Dentre as causas, a precária qualidade da água distribuída a uma parte da população e a ausência de saneamento básico são as principais. Estas infecções acometem principalmente crianças, idosos e imunocomprometidos.

O indivíduo imunocomprometido refere-se ao que não apresenta reações imunitárias normais, ou seja, a uma pessoa cujo sistema imunológico está enfraquecido. Fazem parte desta categoria os pacientes com Aids, em decorrência da redução na linhagem de linfócitos T CD4+ ocasionada pelo vírus HIV. Esta condição torna o indivíduo susceptível a infecções oportunistas, com casos de diarreia grave.

A infecção diarreica pode ser causada por agentes etiológicos como, vírus, protozoários e bactérias. Dentro do grupo das bactérias, a *Escherichia coli* que faz parte da microbiota gastrointestinal dos mamíferos, pode adquirir fatores de virulência característicos que permitem danos à saúde de indivíduos, resultando em síndromes que podem incluir gastroenterites e até colite hemorrágica.

E. coli associadas à infecção intestinal, são denominadas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em oito categorias. Dentre elas, tem-se *E. coli* enteroagregativa (EAEC), caracterizada pela habilidade em produzir o padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais. EAEC podem ser classificadas como EAEC típica para as cepas que apresentam o padrão AA e o gene regulador *aggR* e EAEC atípica para as que apresentam o padrão AA mas não apresentam o gene *aggR*. Assim as EAEC são identificadas pelo seu padrão de adesão AA em cultura de células HEp-2 e pelo diagnóstico molecular pela técnica da PCR.

Deste modo, justifica-se a realização deste trabalho considerada a relevância do estudo de EAEC como agente etiológico da infecção diarreica em pacientes imunocomprometidos com HIV e devido a carência de estudos com esta abordagem na região de Londrina e no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DIARREICA EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS COM HIV

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância a doença diarreica é definida como uma alteração intestinal caracterizada pela ocorrência de evacuações líquidas ou de consistência diminuída em três ou mais episódios em 24 horas, ou ainda uma única semilíquida contendo muco e sangue no período de 12 horas (WHO, 2013). Em condições normais o sistema digestório absorve os eletrólitos e fluídos, aproximadamente 9 litros de fluídos são reabsorvidos diariamente. Entretanto, durante a doença diarreica ocorre uma alteração na movimentação iônica normal (HODGES; GILL, 2010).

Apesar dos avanços da medicina, em todo mundo, anualmente dois milhões de pessoas morrem como vítimas da infecção diarreica, tornando-se, portanto, um problema de saúde pública (BLACK et al., 2010; FISCHER WALKER et al., 2012). Os fatores determinantes para estas mortes são a falta de água potável e de saneamento básico (WHO, 2009).

De acordo com os estudos epidemiológicos realizados por Walker e Black (2010), nas áreas com maior frequência de doenças diarreicas, os agentes infecciosos bacterianos mais comuns são *E. coli* (pertencentes aos patótipos de *E. coli* diarreiogênica - DEC), *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*.

O paciente imunocomprometido é assim classificado por apresentar algum grau de comprometimento do seu sistema imunológico que pode ser desde uma imunodeficiência primária, uma patologia que atue sobre o sistema imunológico, ou ainda, que esteja sendo tratado com fármacos citotóxicos e/ou imunossupressoras (ROITT; DELVES, 2004).

Diversos estudos já apontaram que protozoários, fungos, bactérias e vírus podem acometer pacientes imunocomprometidos sendo nessa situação denominados de patógenos oportunistas, os quais, dependendo da natureza da imunossupressão do paciente, o sistema imunológico não consegue combater (HIERHOLZER, 1992; PATEL; PAIVA, 1997; POLLOCK; FARTHING, 2000; KISHORE et al., 2004; TASHIRO et al., 2006). Uma elevada incidência de infecções

gastrointestinais é observada nos imunocomprometidos que pode chegar a acometer todo o trato gastrointestinal (FORREST, 2004).

Pacientes doentes de Aids, também fazem parte da categoria dos pacientes imunocomprometidos e podem apresentar doença diarreica por fatores infecciosos e não infecciosos. São descritos como fatores infecciosos aqueles causados por agentes microbianos e como não infecciosos fármacos antirretrovirais (THOM; FORREST, 2006).

Nos pacientes soropositivos o HIV induz a destruição dos linfócitos T CD4+, o que torna o organismo mais suscetível a infecções oportunistas (LEWTHWAITE et al., 2005). Observou-se ainda que em pacientes que não são submetidos a terapia com TARV (terapia antirretroviral), apresentam uma maior incidência de infecções gastrointestinais que ocasionam a perda de peso (LEWTHWAITE et al., 2005; THOM; FORREST, 2006).

A doença diarreica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade associada a pacientes com Aids em todo o mundo. Os estudos realizados em países em desenvolvimento apontam que, a diarreia persistente, de duração superior a sete dias, afeta até 95% dos pacientes com Aids (THOM; FORREST, 2006). Nesses pacientes a doença diarreica pode ser causada por diversos agentes microbianos como, vírus, bactérias e protozoários (PIERRE et al., 2004; SESTAK, 2005).

A diarreia bacteriana em pacientes com Aids normalmente é ocasionada pela ação dos patógenos, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella* spp. Entretanto, em pacientes com TARV o perfil microbiológico difere. Os patótipos de DEC (principalmente *E. coli* enteroagregativa - EAEC) se tornaram importantes agentes etiológicos das infecções diarreicas em pacientes soropositivos, após a introdução da terapia desses pacientes com TARV. (GASSAMA-SOW; SOW, 2004).

2.2 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo móvel na maioria das vezes, anaeróbio facultativo que pertence à família Enterobacteriaceae. Faz parte da microbiota intestinal humana proporcionando benefícios para seu hospedeiro. Por outro lado, quando o hospedeiro está debilitado ou imunocomprometido, quando as barreiras gastrintestinais não estão íntegras ou

quando cepas adquirem genes de virulência específicos, as cepas de *E. coli* que fazem parte da microbiota normal podem causar infecções (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em oito patotipos de acordo com os seus mecanismos de virulência, a síndrome clínica que causa, os sorogrupos O e H, os aspectos epidemiológicos, clínicos e os tipos de interações com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Os patotipos de DEC são identificados em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC), *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (CLEMENTS et al., 2012). Embora essa classificação continue sendo amplamente empregada, tem sido demonstrado que algumas categorias incluem microrganismos distintos. Desta forma, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli apresenta diferentes grupos antigênicos, são identificados e caracterizados por diversas combinações do antígeno O (antígeno da parede celular), antígeno K (antígeno capsular) e antígeno H (antígeno flagelar) dando origem a vários sorotipos (EWING, 1986). Na literatura encontram-se descritos mais de 188 antígenos O. Em adição, também foram descritos, pelo menos 53 antígenos H e 74 antígenos K diferentes, possibilitando inúmeras combinações (FRATAMICO., 2016).

Análises filogenéticas têm mostrado que cepas de *E. coli* são classificadas em sete principais grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E e F. A distribuição em grupos filogenéticos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas, além de contribuir para o entendimento de como os genes de virulência são adquiridos (CLERMONT et al., 2013).

2.3 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

As cepas de EAEC são identificadas por sua habilidade em aderir no padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais, como em células

HEp-2 e HeLa. Este padrão foi descrito por Nataro et al. (1987) em um estudo examinando diferentes padrões de adesão de cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia, no Chile.

No padrão de adesão AA ocorre uma ligação íntima das bactérias as células em uma forma de “tijolo empilhado”, a adesão bacteriana pode ocorrer predominantemente na lamínula e/ou nas células epiteliais. O teste de adesão para identificação de EAEC é considerado o padrão ouro, porém, apresenta muitas desvantagens como a sua morosidade (NATARO et al., 1987; JENSEN et al., 2014;).

EAEC é um importante patógeno emergente em todo o mundo, por sua significativa associação com diarreia aguda e persistente (CROXEN et al., 2010). Estudos apontam que EAEC está relacionada com o quadro clínico de diarreia persistente em crianças (duração maior de 14 dias), ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento (HUANG et al., 2007; WEINTRAUB, 2007; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Adultos também podem ser acometidos por diarreia associada a EAEC, principalmente pacientes imunocomprometidos em destaque os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (GASSAMA-SOW; SOW, 2004; MEDINA et al., 2010; JENSEN et al., 2014), pessoas que viajam até países em desenvolvimento (PASCHKE et al., 2011) e também está associado a surtos de diarreia pela ingestão de alimentos e água contaminada (NATARO et al., 2006; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

No trabalho de revisão realizado por Huang et al. (2006), através da análise de artigos publicados entre os anos de 1987, ano que foi descrito o patotipo de EAEC, até o ano de 2006, foi verificado que EAEC estava associada tanto a infecção diarreica aguda como a persistente, a diarreia dos viajantes, a diarreia em pacientes HIV soropositivo e tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento.

Em um estudo realizado na Alemanha com pacientes HIV, foi encontrado pelo teste de adesão, EAEC em 22% das amostras, e pelo teste genotípico em 6% (DURRER et al., 2000). Em estudo realizado por Gassama-Sow et al. (2004) no Senegal, EAEC foi encontrada em 19,6% dos pacientes HIV com diarreia. Na Suíça, DURRER et al. (2000) detectaram genes de EAEC em 6% dos pacientes HIV com diarréia. No Peru, Medina et al. (2010) detectaram EAEC em 6%

das crianças HIV, com diarreia. Já Samie et al. (2007), encontraram EAEC em 29,5% nas amostras de fezes diarréica de paciente adultos soropositivo para HIV.

A patogenicidade da infecção por EAEC ainda não é totalmente elucidada. O maior obstáculo da identificação dos mecanismos de patogênese destas bactérias ocorre, devido à heterogeneidade deste grupo, além da falta de estudos com modelos animal. Diversos estudos têm sugerido os três seguintes estágios para a patogênese de EAEC: (1) aderência a mucosa intestinal, (2) formação de biofilme, e (3) indução da resposta inflamatória e liberação de toxinas (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; JENSEN et al., 2014).

Os principais sintomas associados à infecção por EAEC são: diarreia aquosa e ocasionalmente diarreia mucoide, náuseas, anorexia, febre de baixo grau, ruídos intestinais e tenesmo (OKHUYSEN et al., 2004; NATARO et al., 2006). Infecções crônicas podem levar a subnutrição, além do crescimento debilitado e subdesenvolvimento mental em crianças (STEINER et al., 1998).

Uma das etapas essenciais do processo de patogênese de EAEC é a adesão a mucosa intestinal (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). A adesão agregativa de EAEC está associada principalmente, a presença de adesinas fimbrias conhecidas como *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs) que incluem cinco principais variantes, AAF/I (NATARO et al., 1992), AAF/II (CZECZULIN et al., 1997), AAF/III (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002), AAF/IV (BOISEN et al., 2008) e AAF/V (JONSSON et al., 2015).

EAEC apresenta ainda outros fatores de virulência como toxinas e proteínas secretadas envolvidas em outros processos de virulência. Estes fatores são codificados por genes presentes no DNA cromossômico e plasmidial. O genoma da bactéria EAEC 042 (O44: H18) já foi completamente sequenciado o que permite a melhor compreensão das características genéticas deste microrganismo (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

As cepas de EAEC podem apresentar plasmídeos de alto peso molecular denominados pAA que codificam vários fatores de virulência (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

No plasmídeo denominado pAA1, da amostra protótipo EAEC 17-2 (O3: H2) com tamanho aproximado de 100 Kb, estão presentes os seguintes genes que codificam fatores de virulência: *aggA*, codificador da fímbria de adesão (AAF/I), *aggR*, gene que codifica o regulador transcricional de genes de virulência

plasmidiais e cromossômicos, *astA*, gene que codifica a toxina EAST-1, *aap*, gene que codifica a proteína dispersina (NATARO et al., 1992; NATARO et al., 1994; BOISEN, 2012).

Na cepa 042 encontramos o plasmídeo de tamanho aproximado de 100 Kb denominado de pAA2 que codifica vários fatores de virulência de EAEC bem caracterizados como: *pet*, gene que codifica uma toxina autotransportadora, gene *shf* (*Shigella flexneri* homologue) *astA*, *aafA* responsável pela expressão da fímbria AAF/II, *aggR* e *aap* (CHAUDHURI et al., 2010; CZEZULIN et al., 1999). Na figura 1 está demonstrada a localização dos genes de virulência no plasmídeo pAA2.

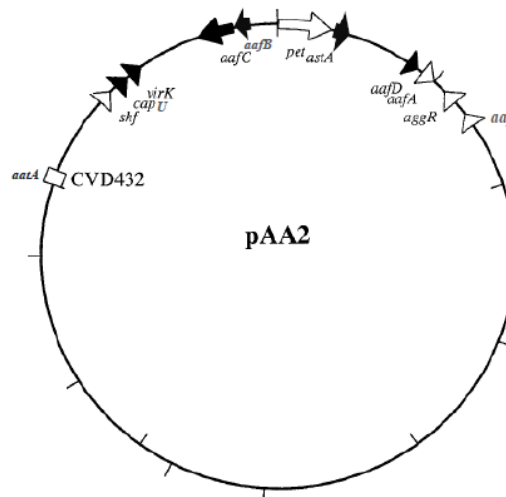


Figura 1 - Plasmídeo de virulência pAA2 com a localização dos genes que codificam fatores de virulência em EAEC. Fonte: Adaptado de Chaudhuri et al. (2010) e Czczulin et al. (1999).

A expressão do gene *aggR* é importante para a patogênese de EAEC. Este gene é um ativador global transcricional que promove a expressão de vários genes de virulência que podem ser plasmidiais ou cromossomais, incluindo a AAF I e II e a dispersina (DUDLEY et al., 2006).

Nataro e Kaper (1998) sugeriram o termo EAEC típica para as cepas que apresentavam o gene regulador *aggR* e ainda, o termo EAEC atípicas para as que não apresentavam o gene *aggR*. Inicialmente, acreditava-se que surtos de diarreia estariam mais relacionados a cepas de EAEC típicas, mas alguns trabalhos vêm mostrando surtos ocasionados por cepas de EAEC atípica (COBELJIĆ et al., 1996).

Outro gene importante é o *aatA*, derivado da sonda pCVD432, responsável pela codificação de uma proteína de membrana que faz parte do sistema de transporte de proteínas (BAUDRY et al., 1990; NISH et al., 2003).

EAEC apresenta ainda uma capacidade importante para sua patogênese que é a formação de biofilme. A formação do biofilme contribui para a persistência da infecção bacteriana, permitindo com que a bactéria evada do sistema imune local, além de tornar os microrganismos mais resistentes a agentes antimicrobianos (TOKUDA et al., 2010; WINGENDER; FLEMMING, 2011).

Diversos genes de virulência estão associados com a formação de biofilme, dentre eles temos o *aatA*, *aap*, *aggR*, as fímbrias AAF, entre outros (WAKIMOTO et al., 2004; MOHAMED et al., 2007). O gene *shf* tem se mostrado intimamente relacionado com a produção de biofilme na cepa de referência 042 (FUJIYAMA et al., 2008).

A proteína antiagregativa também contribui para a patogenicidade de EAEC. Ela atua diminuindo a autoagregação bacteriana e permitindo a dispersão ao longo da mucosa intestinal. Codificada pelo gene *aap*, induz alterações na superfície eletrostática da camada de lipopolissacarídeo das bactérias, neutralizando a carga negativa da superfície bacteriana e permitindo a projeção das fímbrias (SHEIKH et al., 2002; FUJIYAMA et al., 2008).

Após a produção do biofilme algumas toxinas podem ser expressas por este patótipo, que causam danos ao epitélio intestinal e têm importante papel na produção da diarreia secretora (ARENAS-HERNÁNDEZ, 2012). Dentre estas toxinas, temos a Pet, que causa exfoliação celular através da clivagem do citoesqueleto epitelial e está associada com a diarreia mucoide (ESLAVA et al., 1998). O gene *astA*, está associado com a expressão da toxina EAST1, associada a diarreia secretória (MÉNARD; DUBREUIL, 2002). A toxina Sat (*secreted autotransporter toxin*) tem mostrado causar um afrouxamento das junções celulares nos rins, além da vacuolização tanto em células renais quando em células da bexiga (GUYER et al., 2002). Pic (*protein involved in intestinal colonization*) é uma mucinase que interfere na integridade da membrana da mucosa e induz a hemaglutinação (HENDERSON et al., 1999).

O teste de adesão em cultura de células epiteliais é considerado o método ouro para a identificação de EAEC, segundo Nataro et al. (1987). Entretanto, como esse teste é dispendioso, consome tempo e requer infra-estrutura adequada,

diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de genes de virulência de EAEC como alternativa ao teste de adesão (BOISEN et al., 2012; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Os genes *aatA*, *aap* e *aggR*, para a identificação de EAEC são muito utilizados e apresentam resultados satisfatórios (CERNA; NATARO; GARCIA-ESTRADA, 2003; BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; CORDEIRO et al., 2008).

Os protocolos de PCR, na sua maioria, propõem apenas a detecção de genes plasmidiais para a identificação de EAEC típicas deixando de abordar a detecção genotípica de EAEC atípicas (CERNA; NATARO; GARCIA-ESTRADA, 2003; RÜTTLER et al., 2006).

Vários pesquisadores propuseram a utilização de genes cromossomais específicos para EAEC como o *aaiA*, *aaiC* e *aaiG* (DUDLEY et al., 2006; LIMA et al., 2013; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014). Esses genes estão presentes na ilha de patogenicidade cromossomal inserida na região *pheU*, identificada na cepa EAEC 042 (O44:H18) (DUDLEY et al., 2006; MORIN et al., 2013). Análises por microarranjo de DNA têm demonstrado que estes genes são bastante conservados em cepas EAEC clínicas (JENKINS et al., 2006).

Rüttler et al. (2006) desenvolveu um bplex com os marcadores *aggR* e *astA* para o diagnóstico de EAEC e esse não se demonstrou eficiente já que o gene *astA* também foi identificado em outros patótipos de DEC (SAVARINO et al., 1993; SAVARINO et al., 1996).

Jenkins et al. (2006) verificaram que os genes *aatA* e *aaiA* foram eficientes para a identificação de EAEC tanto típicas como atípicas.

Lima et al. (2013) investigaram a prevalência de EAEC em fezes de 166 crianças da região nordeste do Brasil pelo diagnóstico molecular utilizando os genes *aaiC* e *aatA*. Os resultados mostraram que EAEC foi detectada em 68 amostras, sendo o gene *aaiC* o mais prevalente.

Andrade, Gomes e Elias (2014) desenvolveram uma multiplex PCR, com os marcadores de diagnóstico *aaiA*, *aaiG*, *aggR* e *aatA* para identificação de EAEC típica e atípica em 58 cepas de EAEC. A multiplex PCR detectou 38 EAEC típicas e 17 atípicas.

EAEC que apresentam altas taxas de resistência a vários fármacos têm sido reportados em diversos estudos (DURRER et al., 2000; GASSAMA-SOW et al., 2004).

Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a presença de EAEC em pacientes com diarreia infectados pelo HIV, no município de Londrina, Paraná.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 16-18, nov. 2014.

ARENAS-HERNÁNDEZ M. M.; MARTÍNEZ-LAGUNA Y.; TORRES A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Current Gastroenterology Reports** 14:386 –394, 2012.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **Journal Infectious Disease**, v. 161, n. 6, p. 1249-51, jun. 1990.

BERNIER C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF encoding operon family. **Infection and Immunity**, v.70, p.4302-4311, 2002.

BLACK, R. E; COUSES, S.; JOHNSON, H. L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F. et al. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 281-292, 2008.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **Journal Infectious Disease**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, p. 79-83, 2005.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; GARCIA-ESTRADA T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2138-2140, 2003.

CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, mar. 2012.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and

detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 58-65, 2013.

COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiology and Infect**, v. 117, p. 11-16, 1996.

CORDEIRO, F.; PEREIRA D. S. G.; ROCHA, M. et al. Evaluation of a multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, p. 828-829, 2008.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, jan. 2010.

CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4135-45, oct. 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267-82, sep. 2006.

DURRER, P.; ZBINDEN, R.; FLEISCH F. et al. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus infected persons. **Journal Infection Disease**, v.182, p.1540–1544, 2000.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J. R. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 281-298, 2012.

Ewing, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**, 4th ed. Elsevier Science Publishing Company, NY: Elsevier Science Publishing Company;1986.

FISCHER WALKER, C. L.; PERIN, J.; ARYEE, M. J. et al. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 12, p. 220, 2012.

FORREST, G. Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 20, p.16-21, 2004.

FRATAMICO, P.M.; DEBROY, C.; NEEDLEMAN, D.S. Editorial: Emerging approaches for typing, detection, characterization and traceback of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.6-8, 2016.

FUJIYAMA, R. et al. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 474-80, maio, 2008.

GASSAMA-SOW, A. et al. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n.1, p. 75-78, jan. 2004.

GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F. et al. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4539-4546, 2002.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HENDERSON, I. R.; CZEZULIN, J.; ESLAVA, C. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4751-60, nov 1996.

HIERHOLZER, J. C. Adenovirus in immunocompromised host. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p.262-274, 1992.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v. 1, p. 4-21, 2010.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DuPONT, H. L. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, p. 556-563, 2007.

JENSEN, B. H.; OLSEN, K. E. P.; STRUVE, C. et al. Epidemiology and clinical manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 614-630, 2014.

JENKINS, C.; TEMBO, M.; CHART, H. et al. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1493-1497, 2006.

JONSSON, R.; STRUVE, C.; BOISEN, N. et al. Novel Aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.83, p.1396–1405, 2015.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004.

KISHORE, J.; GHOSHAL, U.; GHOSHAL, U. C. et al. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p.1155-1160, 2004.

LEWTHWAITE, P.; GILL, V. G.; HART, C. A. et al. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. **Current Opinion Infectious Diseases**, v.18, p.427-435, 2005.

LIMA, I. F.; BOISEN, N.; QUETZ, J. S. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 62, p. 683-693, 2013.

MEDINA, A. M. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p.158-163, jul. 2010.

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 43-60, 2002.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B.; JIANG, Z. D. et al. Association of putative Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, p. 121–126, 2007.

MORIN, N. et al. Characterization of the *AggR* regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 122-32, jan. 2013.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D. et al. AggR, a transcriptional activator of enteroaggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402–407, 2006.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P.; FLORES, J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Oak Park: Bentham Science Publishers, 2010. cap. 4, p. 48-64. eISBN: 978-1-60805-192-2.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13-24, Jan-Feb 2011.

NISHI, J. et al. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 46, p. 45680-9, nov, 2003.

OKHUUSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; CARLIN, L. et al. Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, p. 1774-1778, 2004.

OKHUUSEN, P. C., DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **The journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 503-506, 2010.

PATEL, R.; PAIVA, C. V. Infections in solid-organ transplant recipients. **Clinical Infectious Reviews**. v.10, n. 1, p.86–124, 1997.

PASCHKE, C. et al. Controlled study on enteropathogens in travelers returning from the tropics with and without diarrhea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1194-1200, ago. 2011.

PIERRE, R.; STEEL, D. J. C.; EVANS, G. T. et al. CDC-defined diseases and opportunistic infections in Jamaican children with HIV/AIDS. **West Indian Medical Journal**, v. 53, p. 315-321, 2004.

POLLOK, R. C. G.; FARTHING, M. J. G. Enteric viruses in HIV-related diarrhea. **Molecular Medicine Today**. v. 6, p.483-487, 2000.

ROITT, I. M. & DELVES, P. J. Imunodeficiências, p. 311- 327. In: I. M. Roitt & P. J. Delves (eds). **Fundamentos de Imunologia**. 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2004.

RÜTTLER, M. E.; YANZÓN, C. S.; CUITIÑO, M. J. et al. Evaluation of a multiplex PCR method to detect Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, p. 301-308, 2006.

SAMIE, A.; OBI, C.L.; DILLINGHAM, R. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: Distribution of Virulence-Related Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Stool Samples of Human Immunodeficiency Virus (

HIV)– Positive and HIV-Negative Individuals and Primary School Children. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.77, p.142–150, 2007.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Infectious Disease**, v. 173, p. 1019–1022, 1996.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SESTAK, K. Chronic diarrhea and AIDS: insights into studies with nonprimates. **Current HIV Research**, v. 3, p.199-205, 2005.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329-37, nov. 2002.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **Journal Infectious Disease**, v.177, n. 1, p. 88-96, jan. 1998.

TASHIRO, Y.; GOTO, M.; TAKEMOTO, Y et al. Epstein-Barr virus-associated enteritis with multiple ulcers after stem cell transplantation: First histologically confirmed case. **Pathology International**. v. 56, p.530-537, 2006.

THOM, K.; FORREST, G. Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 22, p.18-23, 2006.

TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N. et al. Characterization of typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 320-329, 2010.

WALKER, C. L; BLACK, R. E. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 9, p. 1215-1226, set. 2010.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 4-8, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Improving diarrhea estimates**. Child and adolescent health and development. Geneva, 2009.

WHO (World Health Organization); UNICEF (The United Nations Children's Fund). Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025/The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). 2013.

Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79200/1/9789241505239_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 15 jul. 2017.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 214, p. 417-423, 2011.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

*Artigo submetido à revista *Journal of Medical Microbiology*.

Genotypic and phenotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheal feces from human immunodeficiency virus-positive patients from Brazil

Tatiane das Neves Burgos¹,
Angélica Marim Lopes Dambrozio¹,
Paulo Alfonso Schuroff¹,
Sérgio Paulo Dejato da Rocha¹
Eliana Carolina Vespero²
Armando Navarro³,
Jacinta Sanchez Pelayo^{1*}

Running title: EAEC IN HIV PATIENTS

***Corresponding author:** Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 10011, Rodovia Celso Garcia Cid, 86057 – 970, Londrina, PR, Brazil. E-mail: jspelayo@gmail.com

Fone: +55 (43) 3371-4494

1- Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Departamento de Patologia Clínica, Análises Clínicas e Toxicologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

³Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D. F. 04510, México.

Abstract

Purpose: Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathogen that causes gastrointestinal diseases, particularly in immunocompromised patients, resulting in significant morbidity and mortality. This study aimed to verify the prevalence of EAEC in human immunodeficiency virus-positive (HIV) patients in the state of Paraná, Brazil.

Methodology: EAEC was investigated in 275 *E. coli* isolates from diarrheal stools from 55 HIV infected patients hospitalized in the University Hospital of the State University of Londrina. EAEC was characterized and the presence of virulence factors was evaluated using PCR, HEp-2 cell adherence test, and assays for biofilm formation, serotyping, and sensitivity to antimicrobials, along with analysis of phylogeny.

Results: EAEC was detected in 14 (25.4%) HIV infected patients. All strains detected exhibited an aggregate adhesion pattern in HEp-2 cells and were classified into three phylogenetic groups: A (35.7%), B1 (42.9%), and D (21.4%). In addition, 12 different serotypes were identified: O168:H4, O105ab:H6, O59:H19, O59:H6, O120:H25, O43:H2, O159:H-, O145:H34, O32:H14, O175:H28, and O44:H18. Intermediate resistance for cephalothin was verified in three strains (21.4%) and two (14.3%) were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole. Thirteen strains (92.9%) were classified as biofilm forming agents. In addition, the EAECs were classified into two groups according to the presence of the *aggR* gene: EAEC typical (*aggR*-positive; 57.1%) and atypical EAEC (*aggR*-negative; 42.9%).

Conclusion: This is the first study conducted in Brazil to investigate EAEC in HIV infected patients with diarrhea and the results demonstrate a high frequency of EAEC in this group.

Keywords: enteroaggregative *Escherichia coli*, HIV, diarrheic stools.

INTRODUCTION

EAEC is an important emerging pathogen associated with acute and persistent diarrheal infection in children, adults, and HIV infected patients [1-3].

The pathogenesis of EAEC has not yet been fully described and a major obstacle to the identification of the mechanisms of its pathogenesis is the heterogeneity of EAEC strains. Several studies have suggested the following three stages of EAEC pathogenesis: (1) adherence to the intestinal mucosa, (2) biofilm formation, and (3) induction of the inflammatory response and release of toxins [4,3].

The initial process of adherence to the intestinal mucosa involves fimbrial adhesins, such as the five variants of aggregative adherence fimbriae (AAF), AAF I–V [5-9]. After the production of the characteristic biofilm associated with EAEC, toxins may be expressed, causing damage to the intestinal epithelium and playing an important role in the production of secretory diarrhea [10]. Among these toxins, Pet (plasmid-encoded toxin) causes cellular exfoliation and is associated with mucoid diarrhea [11], Pic (protein involved in intestinal colonization) is a mucinase that interferes with mucosal membrane integrity and induces hemagglutination [12], and EAST1 toxin (EAEC heat-stable enterotoxin) is associated with secretory diarrhea [13].

Other virulence factors also contribute to the pathogenicity of EAEC, such as the anti-aggregation protein, dispersin, which is encoded by the *aap* and *shf* (*Shigella flexneri* homologue) genes, and closely related to biofilm production [14].

EAEC are primarily identified by their aggregative adherence pattern (AA) in HEp-2 cell culture; however, as the cell culture adherence assay is expensive, time consuming, and requires adequate cell culture infrastructure, molecular diagnostics have been developed for detection of EAEC [15-17].

The *aggR* and *aatA* genes, which are located on the pAA plasmid, and the chromosomal genes *aaiA* and *aaiC*, are the most commonly used markers for genotypic identification of EAEC, and the *aggR* gene is used to classify this group into typical EAEC (*aggR*-positive) and atypical EAEC (*aggR*-negative) [18,17].

This work is of relevance, since it is the first study carried out in Brazil to verify the prevalence of EAEC in HIV infected patients with diarrhea.

METHODS

Fecal samples and bacterial strains

E. coli isolates were obtained from feces from 55 HIV infected patients with symptoms of gastrointestinal disorders attending the infectious disease room of the University Hospital of Londrina, State University of Londrina (UEL), in the North of Paraná State, Brazil. Feces samples were collected between May 2013 and January 2015. Of a total of 55 patients included in the study, 32 were men, aged between 18 and 83 years and 23 were women between 23 and 83 years old.

Each feces sample was collected using a single rectal swab. Samples were transported to the laboratory in Cary-Blair medium (Difco, USA) and cultured using MacConkey Agar (Difco, USA) plates, which were then incubated at 37°C for 24 h. Five colonies from each plate were selected and examined using biochemical assays [19] to confirm the presence of *E. coli*. *E. coli* isolates were stored in Brain Heart

Infusion media (Difco, USA) plus 20% glycerol (Sigma®) at -80°C.

HEp-2 cell adherence assay

The capacity of isolates to adhere to HEp-2 cells was tested according to the reference method [20] after 6 h of bacteria–cell interaction.

Bacterial DNA isolation

Bacterial DNA was obtained by the boiling method. Briefly, isolates were cultivated on Luria-Bertani Agar (Difco, USA) overnight at 37°C. One colony was resuspended in 300 µL of sterile ultrapure water, boiled at 100°C for 10 min and centrifuged 10 000 x *g* for 5 min.

Detection of virulence genes by PCR

EAEC identification was first performed by screening for the *aggR*, *aatA*, *aaiC*, and *aaiA* diagnostic genes. Further, virulence genes: *astA*, *pet*, *pic*, *aap*, *shf*, *aafA*, *aggA*, *agg3A*, and *agg4A* (Table 1) were screened in isolates positive for the diagnostic genes for EAEC.

Amplification reactions were performed on a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA), in a final volume of 25 µL containing 2 µL of bacterial lysate, 200 µM dNTPs (Invitrogen®), 1X PCR buffer, 2.5 µM MgCl₂, 20 pmol of each primer (Invitrogen®), and 1 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen®). PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized using SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen®) under ultraviolet light (Vilbert

Loumart, France) ECX-20.M.

Phylogenetic groups

Isolates positive for diagnostic genes were tested for phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D) by PCR, according to a reference method [21], using a quadruplex reaction to analyze the DNA markers *arpA*, *chuA*, *yjaA*, and the DNA fragment, TspE4 (Table 1).

Biofilm formation assay

E. coli strains that were positive for some of the genes screened in this investigation were submitted to a biofilm formation assay [22]. Biofilms were considered to have formed when the optical density (OD) value at 570 nm was > 0.2.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility test was performed as described by the Clinical Laboratory Standards Institute [23]. The following antimicrobial agents were used: amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), cefoxitin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), piperacillin/tazobactam (100/10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg) and trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) (Oxoid, UK).

Serotyping

Determination of O and H antigens was carried out as previously described, using a reference method [24], employing all available O (O1–O187) and H (H1–H56) antisera. O and H antisera were produced in the Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México. Isolates that did not react with O antisera were considered as non-typeable (ONT) and those that were nonmotile classified H⁻.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the chi-square test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Detection and characterization of EAEC from stool samples

A total of 275 *E. coli* isolates were collected from the 55 HIV infected patients studied. Among these, EAEC was identified in isolates from 14 patients (25.4%), and the *aggR* gene was found in eight isolates (57.1%), which were, therefore, classified as typical EAEC. Six isolates (42.9%) were classified as atypical EAEC, because they were positive for at least one of the other diagnostic genes (*aaiA*, *aaiC* and *aaiB*) while negative for *aggR* (Table 2).

With respect to the other virulence genes investigated in EAEC isolates (Table 2), those responsible for Pet toxin expression and fibrin adhesins type III and IV (*pet*, *agg3A*, and *agg4A*) were not detected. The *aap* and *aafA* genes, which encode

dispersin and fibrin type II adhesin, were identified in one isolate (7.1%); the *pic* gene, encoding a protein involved in colonization, was observed in two isolates (14.3%); the *aggA* gene, which is related to the expression of fibrin type I adhesin, was found in three isolates (21.4%); the *astA* gene, responsible for EAST1 toxin production, was found in four isolates (28.6%); and the *shf* gene, associated with biofilm production, was positive in eight isolates (57.1%).

Adherence assay

An aggregative adherence pattern was observed in *E. coli* isolates from 50 patients (91%), isolates from two patients (3.6%) presented an undefined pattern (IND), and of one patient (1.8%) a diffuse adhesion pattern (DA), while those of two patients (3.6%) were not adherent to HEp-2 cells. The AA pattern was significantly predominant among the samples analyzed ($p < 0.001$). All EAEC samples showed a pattern of aggregative adhesion to HEp-2 cells (Table 2).

Phylogeny

Regarding the phylogenetic groups, EAEC isolates were distributed into three groups: A (35.7%), B1 (42.9%), and D (21.4%).

Biofilm formation assay

Biofilm formation assays were performed using the 14 EAEC isolates. Among these, 13 (92.9%) were classified as biofilm forming. The *shf* gene, which is associated with biofilm formation in EAEC, was detected in eight strains (57.1%) of the 14 EAEC strains detected in this study. Of the 13 EAEC that exhibited biofilm formation, four (30.7%) were positive for the *shf* and *aggR* genes, and the isolate that did not form biofilms was positive for these two genes.

Antimicrobial susceptibility

The results of the antimicrobial susceptibility assay indicated that two EAEC isolates (14.3%) exhibited resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole and cephalothin (intermediate resistance), and one isolate (7.1%) demonstrated intermediate resistance to cephalothin. The other 11 EAEC isolates were sensitive to all antimicrobials studied (Table 2).

EAEC serotypes

A total of 12 different serotypes were identified in EAEC isolates: O168:H4, O105ab:H6, O59:H19, O59:H6, O120:H25, O43:H2, O159:H-, O145:H34, O32:H14, O8:H51, O175:H28 and O44:H18 (Table 2). Although some EAEC isolates presented with the same serotype (O105 ab:H6 and O44:H18) and phylogenetic group, they exhibited very different genotypic profiles (Table 2).

DISCUSSION

Diarrhea remains a serious health problem in HIV infected patients. Despite the relevance of the association between HIV and diarrhea, no study has previously been conducted to clarify the role of EAEC in this group of patients with diarrhea in Brazil.

According to the literature, few studies have investigated DEC pathotypes in HIV individuals in Brazil. A study analysed feces samples from 55 HIV children, enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) were investigated, but not EAEC; 5% and 17% of samples were positive for EIEC and EPEC, respectively [25]. Another

study investigated EPEC in 42 HIV adults and identified four positive samples (9.6%) [26].

In the present study, EAEC was detected in 14 (25.4%) of 55 HIV infected patients with diarrhea, by molecular diagnosis; however, comparison of the results obtained by molecular diagnosis with those from adherence assays indicated that the detection of EAEC by phenotypic testing was significantly higher than that using the molecular technique ($p < 0.001$). These data demonstrate that the genotypic test did not identify 72% of EAEC compared with the phenotypic test.

In a study of HIV infected patients carried out in Germany, EAEC was detected in 22% of samples by adherence assay, and in 6% by genotype test [27], corroborating the observations in our study; however, the adherence test has some limitations (cost, time required, infrastructure, and specialized labor requirements) that mean it cannot be applied in routine clinical diagnosis. In addition, it is a subjective assay, as it cannot distinguish between pathogenic and non-pathogenic EAEC strains [15,17].

We observed a higher rate of infection with EAEC (25.4%) compared with those reported by other studies: in Senegal, EAEC was detected in 19.6% of HIV infected patients with diarrhea [28]; in Switzerland, EAEC genes were detected in 6% of HIV infected patients with diarrhea [27]; and in Peru, Medina, et al. (2010) reported a positivity rate of 6% for EAEC in diarrheal feces from HIV children [29] however, a study of diarrheic stool specimens from HIV adults in South Africa detected EAEC in 29.5% of samples, which was greater than the percentage identified in this study [2].

EAEC isolates can be classified as typical and atypical EAEC. Those positive for *aggR* were classified as typical EAEC (57.1%), while *aggR*-negative were defined as atypical EAEC (42.9%). Typical EAEC strains had more pathogenic genotypic

profiles than those classified as atypical, and exhibited higher levels of resistance to the antibiotics tested, consistent with the results of previous studies [15,18].

In Peru the *pic* gene was detected more frequently in EAEC isolated from children with diarrhea than in those without diarrhea. In this study, we identified *pic* in two isolates of typical EAEC; however more work is required to verify the importance of atypical EPEC in HIV infected patients [30].

Regarding the phylogenetic groups described by the reference method [21], EAEC samples were classified A, B1, and D. In contrast with the results reported from a study carried out in Egypt, which verified that 73% of EAEC isolates found belonged to phylogenetic group D [31], in our study, only 21.4% of EAEC belonged to this group. In contrast, among eight isolates of EAEC isolated from children with diarrhea in Costa Rica, phylogenetic group D was not detected [32]. A study of EAEC isolates from Nigerian children found that they were distributed among phylogroups A, B1, B2, and D [33]. In our study, no group B2 EAEC isolates were detected. These differences in phylogenetic groups among EAEC isolates may be due to the differing ancestral origins of EAEC isolated at various geographical locations.

Biofilm formation is an important feature of EAEC pathogenesis. After intestinal colonization and mucus secretion, EAEC begin biofilm production, which contributes to persistent infection [18]. Of the 14 EAEC isolates in this study, only one did not exhibit biofilm formation.

Some EAEC genes are described in the literature as involved with biofilm production, including *shf* and *aggR* [14]. In the present study, this association was not observed, since of the 13 EAEC that exhibited biofilm formation, only four (30.7%) were positive for the *shf* and *aggR* genes, and the single isolate that did not

form biofilm did have these two genes, which can be explained by the fact that biofilm production is a multifactorial process [34].

The rate of antimicrobial resistance observed in this study was lower than that reported by other researchers. In Zurich, 71% of the EAEC samples isolated from HIV infected patients were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole, 71% to ampicillin, and 43% to cephalothin [27]. Of the EAEC isolates from HIV infected patients in Senegal, 85% were resistant to ampicillin, 56% to carboxypenicillin, 30% to amoxicillin/clavulanic acid, 78% to trimethoprim/sulfamethoxazole, and 96% to tetracycline [28]. The low rate of resistance identified in this study can be explained by the fact that it is not standard practice in Brazil to adopt antibiotic therapy for the treatment of EAEC infections; as it is a self-limiting infection, the medical therapy used is oral rehydration [18].

The most frequently identified EAEC serotypes are: O3:H2, O15:H18, O44:H18, O86:NM, O77:H18, O111:H12, O111:H21, and O127:H2 [35]. Of serotypes identified in our study, only O44:H18 has been reported by other researchers as associated with cases of diarrhea caused by EAEC [36, 37].

Several studies have shown that a characteristic of EAEC is to present a diversity of serogroups or serotypes and the non-existence of a prevalent serogroup [38-40].

This is an important, unique study of the prevalence of EAEC in HIV infected patients in Brazil, and the results indicate that a high prevalence of EAEC (25.4%) was detected. Our findings also suggest that the genotypic assay employed cannot yet accurately identify EAEC, due to genetic heterogeneity among strains. Thus, it will be important to develop molecular markers that can identify this pathotype, similar to those that have been established for other *E. coli* pathotypes.

Funding information

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Universidade Estadual de Londrina (UEL). The funders had no role in study design, data collection, analysis, publication decision, or manuscript preparation.

Acknowledgements

We thank the Laboratory of Virology (Universidade Estadual de Londrina) for the supply of HEp-2 cell cultures.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

This work was approved by the Committee of Ethics in Research involving Human Subjects of the Universidade Estadual de Londrina (case number: 32838.2012.68).

References

1. **Gioppo NM, Elias WP, Vidotto MC, Linhares RE, SARIDAKIS HO et al.** Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 2000;190:293-298.
2. **Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL.** Enterogaagregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa : Distribution of Virulence-Related Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Stool Samples of Human Immunodeficiency Virus (HIV)– Positive and HIV-Negative Individuals and Primary School Children. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:142–150.
3. **Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM.** Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:614–630.

4. **Navarro-Garcia F, Elias WP.** Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes* 2011;2:13–24.
5. **Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin W C et al.** Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 1992;60:2297-2304.
6. **Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP.** Phylogenetic analysis of Enteroaggregative and Diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:2692-2699.
7. **Bernier C, Gounon P, Le Bouguéne C.** Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF encoding operon family. *Infect Immun* 2002;70:4302-4311.
8. **Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP.** New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 2008;76:3281–3292.
9. **Jonsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RM, Santiago AE, et al.** Novel Aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2015; 83:1396–405.
10. **Arenas-Hernández MM, Martínez-Laguna Y, Torres AG.** 2012. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr Gastroenterol Rep* 2012;14:386–394.
11. **Eslava C, Navarro-García F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A et al.** Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1998;66:3155-3163.
12. **Henderson, IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP.** Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:5587–5596.
13. **Ménard LP, Dubreuil JD.** Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* 2002;28:43-60.
14. **Fujiyama R, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Manago K et al.** The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. *Curr Microbiol* 2008; 56:474-480.
15. **Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR.** Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:13–19.

16. **Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F.** Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;66:281–298.
17. **Andrade FB, Gomes TAT, Elias WP.** A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2014;106:16-18.
18. **Tokuda K, Nishi J, Imuta N, Fujiyama R, Kamenosono A et al.** Characterization of typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiol Immunol* 2010;54:320-329.
19. **Ewing WH.** *Identification of Enterobacteriaceae*, 4nd ed. Elsevier Science Publishing Company, NY: Elsevier Science Publishing Company;1986.
20. **Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B.** An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979;3:95-99.
21. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4555–4558.
22. **Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J et al.** Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:687-690.
23. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Performance standards for 297 antimicrobial susceptibility testing*, 27rd ed, M100S. Wayne, PA, USA: CLSI; 2017.
24. **Guinée PAM, Jansen HW, Wadstrom T, Sellwood R et al.** *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: De Leeww PW, Guinée PAM (editors). *Current Topics in Veterinary and Animal Science*. Dordrecht: Springer; 1981, pp. 126–162.
25. **Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Costa Oliveira JG, Barbosa DM et al.** Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diag Microbiol infect Dis* 2007;57: 59-66, 2007.
26. **Gomes TA, Irino K, Girao DM, Girao VB, Guth BE et al.** Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* 2004; 10:18 51–1855.
27. **Durrer P, Zbinden R, Fleisch F, Altwegg M, Ledergerber B, et al.** Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus infected persons. *J Infect Dis* 2000;182:1540–1544.
28. **Gassama-sow A, Sow OS.** Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* in Human Immunodeficiency Virus – Related Diarrhea in Senegal. *J Infect Dis*

2004;189:75–78.

29. **Medina AM, Rivera FP, Romero LM, Kolevic LA, Castillo ME et al.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Pediatric Patients in Lima, Perú. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:158–163.
30. **Durand D, Contreras CA, Mosquito S, Ruíz J, Cleary TG et al.** *Pic* gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. *Pathog Dis* 2016;74:1-8.
31. **Ali MM, Ahmed SF, Klena JD, Mohamed ZK, Moussa TA, Ghenghesh KS.** Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. *J Infect Dev Ctries* 2014;8: 589-596.
32. **Pérez C, Gómez-Duarte OG, Arias ML.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:292-297.
33. **Okeke IN, Wallace-Gadsden F, Simons HR, Matthews N, Labar AS et al.** Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *PLoS One* 2010;5:e14093.
34. **Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T.** Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002;184:290-301.
35. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:142–201.
36. **Scotland SM, Smith HR, Said B, Willshaw GA, Cheasty T et al.** Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and-effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. *J Med Microbiol.* 1991 Nov;35:278-283.
37. **Smith HR, Scotland SM, Willshaw GA, Rowe B, Cravioto A et al.** Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *J Infect Dis.* 1994;170:1610-1613.
38. **Dallman TJ, Chattaway MA, Cowley LA, Doumith M, Tewolde R et al.** An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multipathogen foodborne outbreak in the UK. *PLoS One* 2014;9:e98103.
39. **Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S et al.** Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4111–4120.
40. **Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Irino K, Teixeira L M.** Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains

isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Med Microbiol* 2009;58:414–422.

41. **Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J et al.** Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995;33:701–705.
42. **Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S et al.** Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis* 2012;205:431-444.
43. **Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP.** Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2006;61:1267-1282.
44. **Lima IF, Boisen N, Quetz Jda S, Havt A, de Carvalho EB et al.** Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J Med Microbiol* 2013;62:683-693.
45. **Mohamed JA, Huang DB, Jiang ZD, DuPont HL, Nataro JP et al.** Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in 89 isolates from travelers to developing countries. *J Clinical Microbiol* 2007;45:121-126.
46. **Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM.** Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1553-1562.
47. **Piva IC, Pereira AL, Ferraz LR, Silva RS, Vieira, AC et al.** Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J Clinical Microbiol* 2003;41:1827-1832.

Table 1. Primer sequences, sizes of products obtained, and corresponding references for the genes analyzed in this study

Gene	Sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	[41]
<i>aggR</i>	(F) GCAATCAGATTAARCAGCGATACAC (R) ATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	426	[42]
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	[43]
<i>aaiC</i>	(F) ATTGTCCTCAGGCATTTACACG (R) ACACCCCTGATAAACAA	215	[44]
<i>shf</i>	(F) ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATTC (R) ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTTCAT	613	[6]
<i>astA</i>	(F) ATGCCATCAACACAGTATATGC (R) GAGTGACGGCTTTGTAGT	110	[45]
<i>pet</i>	(F) GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT (R) CCTCTTGTTTTCCACGACATAC	302	[46]
<i>pic</i>	(F) TTCAGCGGAAAGACGAA (R) TCTGCGCATTACATCA	500	[47]
<i>aap</i>	(F) GGACCCGTCCCAATGTATAACCATTC (R) GGTTAGAGCACGAT	250	[42]
<i>aggA</i>	(F) TCTATCTRGGGGGGCTAACGCTA (R) CCTGTTCCCATAACCAGACC	220	[42]
<i>aafA</i>	(F) CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGC (R) TAGGAGAGGCCAGAGTGAATCCTG	289	[42]
<i>agg3A</i>	(F) CCAGTTATTACAGGGTAACAAGGGA (R) ATTGGTCTGGAATAACAACCTTGAACG	370	[42]
<i>agg4A</i>	(F) TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGACACC (R) ATAAGCCGCCAAATAAGC	169	[42]
<i>arpA</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCATAACCGTACGCTA	400	[21]
<i>chuA</i>	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	[21]
<i>yjaA</i>	(F) CAAACGTGAAGTGTCCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	[21]
TspE4. C2	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC (R) AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	[21]

Table 2. Genotypic and phenotypic characteristics of EAEC isolates from HIV+ patients

Patient	Biofilm formation	Classification of EAEC [§]	HEp-2 adhesion	Phylogenetic group	Phenotypic profile	Serotype	Resistance profile
06/2013	+	tEAEC	Aggregative	A	<i>aatA aggR aggA astA</i>	O168 H4	Sensitive
07/2013	+	tEAEC	Aggregative	A	<i>aatA aggR aggA astA</i>	O105ab H6	Sensitive
16/2013	+	tEAEC	Aggregative	A	<i>aatA aggR shf</i>	O59 H19	Sensitive
17/2013	+	tEAEC	Aggregative	B1	<i>aatA aggR shf</i>	O59 H6	Sensitive
31/2013	+	tEAEC	Aggregative	D	<i>aatA aggR aggA</i>	O120 H25	STX [†] / KF [*]
33/2013	+	aEAEC	Aggregative	B1	<i>aatA aaiA astA</i>	O43 H2	Sensitive
36/2013	+	aEAEC	Aggregative	B1	<i>aaiA shf</i>	O159 H? [∞]	Sensitive
37/2013	+	aEAEC	Aggregative	A	<i>aaiA</i>	O145 H34	Sensitive
41/2013	+	aEAEC	Aggregative	A	<i>aaiA shf</i>	O105ab H6	Sensitive
48/2014	+	tEAEC	Aggregative	B1	<i>aggR shf</i>	O32 H14	STX / KF
57/2014	+	aEAEC	Aggregative	B1	<i>aaiA</i>	O8 H51	Sensitive
61/2014	+	aEAEC	Aggregative	B1	<i>aatA aap pic aafA shf</i>	O175 H28	Sensitive
69/2014	+	tEAEC	Aggregative	D	<i>aatA aaiC aaiA aggR pic astA shf</i>	O44 H18	KF
73/2014	-	tEAEC	Aggregative	D	<i>aaiC aaiA aggR shf</i>	O44 H18	Sensitive

[§]tEAEC, typical EAEC; aEAEC, atypical EAEC; [†]STX, Trimethoprim/Sulfamethoxazole; KF, Cephalothin; ^{*} Drug resistance is intermediate according to CLSI (2017); [∞]Not typeable.

5. CONCLUSÕES

Destaca-se a importância deste trabalho, pois não existem estudos no Brasil sobre a prevalência de EAEC em pacientes HIV e nesse trabalho foi verificada uma alta frequência de EAEC (25,4%) nesses pacientes, comparado a outros estudos realizados. Verificou-se também que o ensaio genotípico até o momento ainda não apresenta boa sensibilidade e especificidade para identificação de EAEC, devido a heterogeneidade genética das cepas, por isso são importantes os estudos com EAEC e o desenvolvimento de novos marcadores moleculares que consigam identificar esse patotipo, assim, como se tem bem estabelecidos marcadores moleculares para outros patotipos de *E. coli*